Journal of Metallurgical and Materials Engineering, 35, 2. 2024.(1-14)

Ferdowsi University of Mashhad

Journal of Metallurgical and Materials Engineering

https://jmme.um.ac.ir

Iron&Steel Society of Iran

Characterization of Polycaprolacton/Gelatin/Chitosan Scaffold Fabricated by Dual Electrospinning Method

Research Article

Mina Parnian[1], Seyed Mojtaba Zebarjad[2]

DOI: 10.22067/jmme.2024.84247.1123

1.Introduction

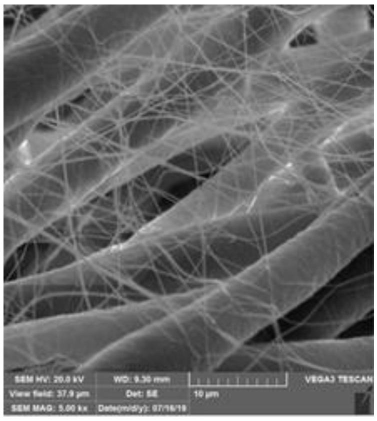
The electrospinning process is one of the most well-known methods for making nano and micrometer diameter fibers that have a high surface-to-volume ratio. Parameters such as concentration, feeding rate and voltage play important roles in the morphology of the electrospun fibers. Some researchers have conducted researches on the morphology and electrospinning parameters of poly-caprolactone, gelatin and chitosan. Based on theie researches, it seems that the effect of electrospinning parameters on ternary composites has been paid less attention. For this purpose, in this research, it has been tried to fabricate scaffolds made of natural and synthetic polymers. To do so gelatin/chitosan/polycaprolactone composite nanofibers were produced using the electrospinning method.

2. Experimental

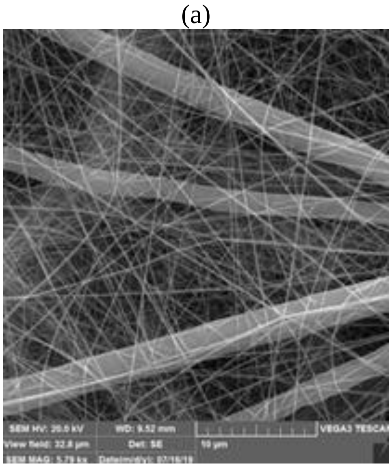
In order to prepare ternary composite fibers, the concentration of polycaprolactone, gelatin and chitosan solutions was considered to be 15, 25 and 3% wt%, respectively. The electrospinning process was carried out using an electrospinning machine made by Nanoazma Company. The solution of polycaprolactone in a 5 ml syringe and the combination of gelatin-chitosan solutions in an another syringe were inserted into different pumps of the device. The feeding rate of the solution for gelatin/chitosan solution was 0.2 ml/h and for polycaprolactone changed from 0.2 to 1.5 ml/h. The rotation speed of the cylinder was 100 rpm and the applied voltage was kept constant at 15 kv. Aluminum foil was used to collect the scaffolds on the collector. The details of the produced samples are given in Table 1. The samples were cross-linked in glutaraldehyde vapor with 25% by weight.

Table I: The details of sample preparation

Sample code	Distance(Cm)	Feed rate(ml/h)	Voltage (kv)
PGC1	10	0.2-1.5	15
PGC2	10	0.2-0.6	15
PGC3	10	0.2-0.4	15
PGC4	10	0.2-0.2	15



(a)



(b)

Figure (1) SEM micrograph thaken from samples with ratios of polycaprolactone to gelatin-chitosan a) 10-90 and b) 40-60.

3. Results and discussion

FTIR study shows the presence of chitosan and gelatin in the gelatin-chitosan samples. Also after cross-linking, a new peak appeares at the wave number of 1030 cm^{-1}.

The SEM images for samples with ratios of polycaprolactone to gelatin-chitosan 10-90 and 40-60 are shown in Figures (1-a) and (1-b) respectively.

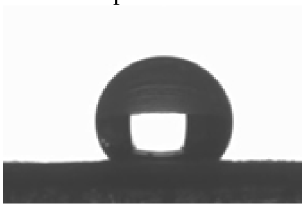
*Manuscript received: September 2, 2023, Revised January 1, 2024, Accepted, February 26, 2024 .

[1] MS.c. Department of Enginerring Materials, Engineering Faculty, Shiraz University, Shira, Iran.

[2] Correspounding Author: Proofesor Department of Enginerring Materials, Engineering Faculty, Shiraz University, Shira, Iran.

Email: Mojtabazebarjad@shirazu.ac.ir

Contact angle test was done on the samples. The results show the dependency of contact angle on the percentage of gelatin-chitosan to polycaprolactone. In another word hydrophilicity of PCL will be changed in the presence of gelatin and chitosan. Breifly, the contact angle of the scaffold made of PCL is about 98 degrees, while the addition of gelatin and chitosan significantly reduces it to about 22. Figure (2) shows the results of contact test for pure PCL and PGC4 samples.



a)



b)

Figure 2: The results of contact test for
a) Pure PCL b) PGC4

Evaluation of degradability in phosphate buffered saline solution shows that the weight loss of the scaffolds promotes as time increases from 1 to 28 days. Considering that the nature of polycaprolactone is hydrophobic and the nature of gelatin-chitosan is hydrophilic. The highest rate of degradation is in gelatin-chitosan fibers with more than 50% degradation after 28 days and the lowest degradation rate is related to the sample containing 70% by weight of PCL with less than 23% degradation after 28 days.

4. Conclusion

Polycaprolactone-gelatin-chitosan ternary composites with different weight ratios of polycaprolactone (70, 80, 90 and 60) were made by double-sided electrospinning method. The samples were cross-linked in glutaraldehyde vapor with 25% by weight. Microscopic evaluation indicated the proper formation of the composite. FTIR analysis confirmed the bonding between the components in the composite samples. Also, the results of the water contact angle test showed promotion the hydrophilicity of the PCL scaffold by adding gelatin and chitosan. The contact angle of pure PCL reached from 98 degrees to about 22 degrees at the presence of gelatin and chitosan. The evaluation of degradability in phosphate buffered saline solution showed that the weight loss of the fabricated scaffolds occurs with the passage of time from 1 to 28 days for all scaffolds. Because of the nature of polycaprolactone and gelatin-chitosan, the highest degradation rate after 28 days belongs to gelatin-chitosan fibers with more than 50% and the lowest degradation rate related to the sample containing 70 wt% PCL with less than 23%.

مهندسی متالورژی و مواد

https://jmme.um.ac.ir/

انجمن آهن و فولاد ایران

دانشگاه فردوسی مشهد

بررسی خواص داربست پلی‌کاپرولاکتون/ژلاتین/کیتوسان تولید شده به روش الکتروریسی دو طرفه*

مقاله پژوهشی

مینا پرنیان[۱] سید مجتبی زبرجد[۲]

DOI: 10.22067/jmme.2024.84247.1123

چکیده در مطالعه‌ی حاضر، طرح جدیدی برای ساخت داربست‌های پلی‌کاپرولاکتون (PCL)/ ژلاتین (GEL)/ کیتوسان (CS) به منظور افزایش عملکرد در مهندسی بافت عروق پیشنهاد شده است. از پلیمر مصنوعی PCL جهت بالا بردن خواص مکانیکی داربست و همچنین از دو پلیمر طبیعی GEL و CS به عنوان عوامل موثر در تحریک و تکثیر سلول‌ها استفاده شده است. کامپوزیت‌های سه‌تایی پلی‌کاپرولاکتون-ژلاتین-کیتوسان با نسبت‌های مختلف وزنی پلی‌کاپرولاکتون (۹۰، ۸۰، ۷۰ و ۶۰) به روش الکتروریسی دو طرفه ساخته شدند. نمونه‌ها در معرض بخار گلوتارآلدهید با غلظت ۲۵ درصد وزنی اتصال عرضی داده شدند. ارزیابی میکروسکوپی نشانگر تشکیل مناسب کامپوزیت مذکور می‌باشد. آنالیز FTIR پیوند بین اجزاء در نمونه‌های کامپوزیتی را تایید کرد. همچنین نتایج حاصل از آزمون زاویه تماس آب نشان از آب‌دوست شدن داربست زمینه PCL با افزودن ژلاتین و کیتوسان می‌باشد. به‌طوریکه زاویه تماس PCL خالص از ۹۸ درجه به حدود ۲۲ درجه با حضور ژلاتین و کیتوسان می‌رسد. ارزیابی تخریب‌پذیری در محلول فسفات بافر سالین نشان داد که کاهش وزن داربست‌های ساخته شده با گذشت زمان از ۱ تا ۲۸ روز برای همه‌ی داربست‌ها اتفاق می‌افتد. با توجه به اینکه ماهیت پلی‌کاپرولاکتون آب‌گریز و ماهیت ژلاتین-کیتوسان آب‌دوست می‌باشد، بیشترین میزان تخریب در الیاف ژلاتین - کیتوسان با بیش از ۵۰ درصد تخریب پس از ۲۸ روز و کمترین میزان تخریب مربوط به نمونه حاوی ۷۰ درصد وزنی PCL با کمتر از ۲۳ درصد تخریب پس از ۲۸ روز می‌باشد.

واژه های کلیدی پلی‌کاپرولاکتون، ژلاتین، کیتوسان، داربست، الکتروریسی

Characterization of Polycaprolacton/ Gelatin/ Chitosan Scaffold fabricated by Dual Electrospinning Method

Mina Parnian   Seyed Mojtaba Zebarjad

Abstract *In the present study, a design for the construction of poly-caprolactone (PCL)/gelatin (GEL)/chitosan (CS) scaffolds has been proposed in order to increase performance in tissue engineering. The artificial polymer PCL is used to increase the mechanical properties of the scaffold, and two natural polymers GEL and CS are used as factors in the proliferation of cells. Polycaprolactone-gelatin-chitosan ternary composites with different weight ratios of polycaprolactone (70, 80, 90 and 60) were made by double-sided electrospinning method. The samples were cross-linked in glutaraldehyde vapor with 25% by weight. Microscopic evaluation indicates the proper formation of the composite. FTIR analysis confirmed the bonding between the components in the composite samples. Also, the results of the water contact angle test showed promotion the hydrophilicity of the PCL scaffold by adding gelatin and chitosan. So that the contact angle of pure PCL reaches from 98 degrees to about 22 degrees with the presence of gelatin and chitosan. The evaluation of degradability in phosphate buffered saline solution showed that the weight loss of the fabricated scaffolds occurs with the passage of time from 1 to 28 days for all scaffolds. Because of the nature of poly-caprolactone and gelatin-chitosan, the highest degradation rate after 28 days in gelatin-chitosan fibers is more than 50% and the lowest degradation rate related to the sample containing 70 wt% PCL is less than 23%.*

Keywords Polycaprolacton, Gelatin, Chitosan, Electrospinnin, Scaffold.

* تاریخ دریافت مقاله ۱۴۰۲/۶/۱۱و تاریخ پذیرش آن۱۴۰۲/۱۲/۷ می‌باشد.

(۱) کارشناس ارشد، بخش مهندسی مواد، دانشکده مهندسی، دانشگاه شیراز، شیراز.

(۲) نویسنده مسئول: استاد، بخش مهندسی مواد، دانشکده مهندسی، دانشگاه شیراز، شیراز.

Email: Mojtabazebarjad@shirazu.ac.ir

مقدمه

در سال‌های اخیر، استفاده از پلیمرهای زیستی در مهندسی بافت مورد توجه قرار گرفته است. از جمله مزایای پلیمرهای زیستی می‌توان به زیست‌سازگاری و زیست‌تخریب‌پذیری آنها اشاره کرد [1]. پلی‌کاپرولاکتون، پلیمر مصنوعی زیست‌تخریب‌پذیر، غیر سمی، ارزان و مقاوم در برابر آب است. این پلیمر به دلیل داشتن خواص مکانیکی عالی و همچنین سهولت در تولید توجه بسیاری را در زمینه زیست پزشکی به خود جلب کرده است. اما به دلیل ماهیت آب‌گریز بودن، فاقد چسبندگی سلولی مناسب است [2]. ژلاتین نیز پلیمر طبیعی است که از کلاژن مشتق شده است. این پلیمر بسیار زیست‌سازگار ، نسبتا ارزان، تجزیه‌پذیر و غیر سمی است. صنایع غذایی و دارویی، اصلی‌ترین مصرف‌کنندگان ژلاتین هستند. بیشترین کاربرد ژلاتین در زمینه زیست پزشکی تولید کپسول های سخت و نرم، پانسمان زخم و همچنین بازسازی سه بعدی بافت است. این پلیمر مانند اغلب پلیمرهای طبیعی خواص مکانیکی ضعیفی دارد [3]. کیتوسان، پلیمر کاتیونی طبیعی، زیست‌تخریب‌پذیر، زیست‌سازگار و غیرسمی می‌باشد و به علت خصوصیات ذاتی مفید، توجه بسیاری را در کاربردهای مختلف زیست دارویی به خود جلب کرده است. اگرچه خواص مکانیکی آن نیز ضعیف است [2].

به منظور استفاده‌ی همزمان از مزایای هردو گروه از پلیمرهای طبیعی و مصنوعی، تولید کامپوزیت‌های متشکل از این دو، کارآمد خواهد بود. علاوه بر ترکیب کامپوزیت، ساختار و مورفولوژی آن نیز در خواص و عملکرد نهایی آن بسیار اهمیت دارد [3-1]. از مهمترین مورفولوژی‌های مطلوب در مهندسی بافت، به ویژه در ساخت داربست‌ها می‌توان به الیاف اشاره کرد. فرایند الکتروریسی از شناخته ترین روش‌ها برای ساخت الیاف با قطر نانو و میکرومتری است که نسبت سطح به حجم بالایی دارند. پارامترهای مهمی مانند غلظت، نرخ تغذیه، ولتاژ و ...بر مورفولوژی محصول ناشی از فرایند الکتروریسی نقش دارند. بر اساس مطالعات صورت گرفته برخی از محققین تحقیقاتی را در رابطه با مورفولوژی و پارامترهای الکتروریسی پلی‌کاپرولاکتون، ژلاتین و کیتوسان انجام داده‌اند.به طور مثال همایونی و همکاران [4] الکتروریسی کیتوسان خالص را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان می‌دهد که کیتوسان به دلیل داشتن ویسکوزیته‌ی بالا به سختی الکتروریسی می‌شود. با استفاده از روش قلیایی می‌توان هیدرولیز زنجیره‌های کیتوسان را کاهش داده و در نتیجه ساختاری نانوالیافی با کیفیت و ثبات مناسب تولید کرد. [4]. جعفری و همکاران[5] محلول‌های کیتوسان/ژلاتین را با درصدهای وزنی مختلف تولید و نشان دادند که یکنواختی الیاف تولیدی و تشکیل مهره وابسته به ولتاژ با و نرخ جریان می‌باشد. گوتام و همکاران[6] داربست نانوکامپوزیتی سه فازی از PCL/ ژلاتین/کیتوسان را به روش الکتروریسی تولید کردند. آنها از کلروفرم/متانول به عنوان حلال مناسب برای PCL و ازاسید استیک برای کیتوسان و ژلاتین استفاده کردند. آنها سه پلیمر را در نسبت‌های حجمی مختلف ترکیب کردند و نسبت ۸۰:۱۰:۱۰ را با ولتاژ بالای ۲۲ کیلوولت و نرخ جریان ۰٫۱$\frac{ml}{h}$ و فاصله‌ی ۱۰ سانتی‌متر به عنوان شرایط مطلوب گزارش شد.

ژانگو همکاران [7] الیاف ژلاتین و ترکیب ژلاتین- پلی-کاپرولاکتون را تولید کرده و از تری‌فلوئوروواتان (TFE) به عنوان حلال استفاده کردند . نتایج ارزیابی انها نشان داد که داربست‌های ترکیب ژلاتین- پلی‌کاپرولاکتون خواص مطلوبتری نسبت به ژلاتین و پلی‌کاپرولاکتون خالص دارند. تصاویر میکروسکوپی الکترونی نیز نشان داد که سلول‌ها علاوه بر اینکه چسبندگی خوبی را بر سطح داربست‌ها داشتند قادر به مهاجرت در داخل داربست نیز هستند. یانگ و همکاران [8]، با استفاده از الکتروریسی، داربست‌های عروقی Cs/PCL را تولید و نشان دادند که داربست‌ها دارای تخلخل سطحی بالا و قابلیت تغییر شکل الاستیک مناسب و رشد و تکثیر سلولی خوبی هستند. دانداتاپانی و همکارانش [9] ترکیب تری‌فلوئوروواستیک‌اسید دی‌کلرومتان با نسبت‌های حجمی (۷:۳) را به عنوان حلال مشترک برای کیتوسان و ژلاتین به کار برده و نمونه‌های الکتروریسی شده را مورد ارزیابی ساختاری قرار دادند. نتایج آزمون کشش هم حاکی از آن بود که کامپوزیت دوتایی، استحکام کششی بیشتری نسبت به هر کدام از مواد خالص دارد.

براساس تحقیقات انجام شده به نظر می‌رسد اثر پارامترهای الکتروریسی روی کامپوزیت‌های سه‌گانه کمتر مورد توجه قرار گرفته است. بدین منظور در این پژوهش سعی شده است که با استفاده از پلیمرهای طبیعی و مصنوعی و بهره گیری از خواص هر یک و همچنین با استفاده از روش الکتروریسی، داربست‌هائی از جنس نانوالیاف کامپوزیتی ژلاتین–کیتوسان–پلی‌کاپرولاکتون تهیه و مورفولوژی و زیست تخریب پذیری آن‌ها مورد ارزیابی

قرار گیرد.

مواد و روش تحقیق

مواد

در جدول (۱) مشخصات مواد اولیه موردنیاز به منظور تولید داربست‌ها به روش الکتروریسی ارائه شده است.

الکتروریسی

جهت تهیه الیاف کامپوزیت سه‌تایی، غلظت محلول‌های پلی-کاپرولاکتون، ژلاتین و کیتوسان به ترتیب ۱۵، ۲۵ و ۳ درصدوزنی در نظر گرفته شد. فرایند الکتروریسی با استفاده از دستگاه الکتروریسی ساخت شرکت نانوآزما انجام شد. محلول پلی-کاپرولاکتون در سرنگ ۵ میلی‌لیتر و ترکیب محلول‌های ژلاتین–کیتوسان در سرنگی مجزا درون پمپ‌های مختلفی از دستگاه تعبیه شدند. نرخ خروج محلول برای محلول ژلاتین/کیتوسان ۰/۲ml/h و برای پلی‌کاپرولاکتون با توجه به نسبت‌های مختلف ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶ و ۱/۵ میلی‌لیتر بر ساعت و سرعت چرخش استوانه rpm ۱۰۰ و ولتاژ ۱۵kv انتخاب شد. از فویل آلومینیومی جهت جمع-آوری داربست‌ها بر روی جمع‌کننده استفاده شد . جزئیات نمونه-های تولید شده در جدول (۲) آورده شده است.

ایجاد اتصال عرضی

ماهیت آبدوستی و حلالیت بالای دو پلیمر ژلاتین و کیتوسان در محیط اســـیدی رقیق و محیط‌های آبی، ویژگی نامطلوب برای داربست‌ها می‌باشد. بنابراین افزایش پایداری داربست‌ها با ایجاد اتصـال عرضـی یک امر ضـروری می‌باشـد. در این تحقیق و به منظور ایجاد اتصـــال عرضـــی بخار گلوتارآلدهید به عنوان یک عامل ایجاد اتصال عرضی انتخاب شد. بدین منظور 5ml محلول آبی گلوتارآلدهید ۲۵٪ در یک پتری‌دیش ریخته و در قســـمت پایین د سیکاتور قرار داده شد. سپس نمونه ها درون د سیکاتور قرار گرفته و به مدت ۲ ساعت در دمای محیط درون د سیکاتور در معرض بخار گلوتارآلدهید قرار گرفتند.

جدول ۱ مشخصات مواد و تجهیزات مورد استفاده در پژوهش

ردیف	نام ماده	ترکیب شیمیایی	شرکت سازنده	کاربرد
۱	پلی‌کاپرولاکتون	(C6H10O2)n	Sigma Aldrich	ساخت داربست
۲	کلروفرم	CHCl3	merck	ساخت محلول
۳	ژلاتین	–	Merck	ساخت داربست
۴	استیک اسید	CH3COOH	Merck	ساخت محلول
۵	کیتوسان	C8H13NO5	Sigma Aldrich	ساخت
۶	گلوتارآلدهید	C5H8O2	Merck	ایجاد اتصال عرضی
۷	PBS	–	زیست فناوری طیبا	زیست تخریب‌پذیری

جدول ۲ جزئیات نمونه‌های سه‌تایی پلی‌کاپرولاکتون–ژلاتین–کیتوسان

شماره نمونه	محلول	درصدوزنی	درصد محلول	ولتاژ (kv)	نرخ‌تغذیه (ml/h)	فاصله (cm)
PGC1	PCL-GEL-CS	۱۵–۴۰–۳	۹۰–(۱۰–۹۰)	۱۵	۱/۵– ۰/۲	۱۰
PGC2	PCL-GEL-CS	۱۵–۴۰–۳	۸۰–(۱۰–۹۰)	۱۵	۰/۶– ۰/۲	۱۰
PGC3	PCL-GEL-CS	۱۵–۴۰–۳	۷۰–(۱۰–۹۰)	۱۵	۰/۴– ۰/۲	۱۰
PGC4	PCL-GEL-CS	۱۵–۴۰–۳	۶۰–(۱۰–۹۰)	۱۵	۰/۲– ۰/۲	۱۰

آنالیز طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR)

مشخصه یابی فروسرخ روشی برای شناسایی و ارزیابی ترکیبات آلی و معدنی و گروه عاملی آن‌هاست. جهت مطالعه‌ی پیوند بین اجزای کامپوزیت‌ها و همچنین اطمینان از ایجاد اتصال عرضی در نمونه‌ها، قبل و بعد از اضافه کردن کیتوسان به ژلاتین و همچنین بعد از در معرض قرار دادن با بخار گلو تارآ لدهید آزمون FTIR به و سیله‌ی د ستگاه Thermo Scientific ساخت کشور آمریکا انجام و عدد موج پرتوی تابیده شده در محدوده‌ی Cm-1 ۴۰۰۰–۴۰۰ در نظر گرفته شد.

ارزیابی میکروسکوپی

ساختار و مورفولوژی داربست‌های تولید شده به وسیله‌ی میکروسکوپ الکترونی روبشی مدل Cambridge-s320 ساخت انگلستان با ولتاژ شتاب‌دهنده‌ی kV ۲۰ و فاصله‌ی کاری mm ۹– ۱۲ مورد ارزیابی قرار گرفت. به دلیل نارسانا بودن سطح نمونه‌ها، نمونه‌ها قبل از تصویربرداری با لایه‌ی نازک طلا به وسیله‌ی دستگاه Palaron SC7640 پوشش داده شدند. سپس با استفاده از نرم‌افزار ImageJ و با انتخاب ۳۰ لیف در تصاویر و اندازه‌گیری قطر آنها، تصاویر SEM آنالیز و بررسی شدند و قطر میانگین نمونه‌ها بدست آمد.

آزمون آبدوستی

برای تعیین میزان آبدو ستی دارب ست‌ها، آزمون زاویه تماس آب انجام شد. حجم قطره در این آزمون µl ۸ و دستگاه اندازه‌گیری زاویه تماس Jikan CAG-10 بود. دمای انجام آزمون ۲۵ درجه سانتیگراد و زوایا به وسیله‌ی نرم‌افزار ImageJ به‌دست آمدند.

بررسی زیست تخریب‌پذیری

ارزیابی زیست‌تخریب‌پذیری نمونه‌ها با استفاده از غوطه‌وری آنها در محلول فسفات‌بافرسالین (PBS) انجام شد. پس از تهیه‌ی PBS، مقدار سه میلی‌لیتر از محلول را درون فالکون‌های جداگانه ریخته و نمونه‌های مورد نظر درابتدا وزن و درون هر فالکون قرار داده شدند. سپس تمامی فالکون‌ها در انکوباتور و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱، ۳، ۷، ۱۴، ۲۱، ۲۸ روز قرار داده شدند. پس از آن نمونه‌ها از فالکون خارج و پس از چندین بار شست و شو در دمای اتاق، خشک و سپس مجددا وزن شدند. با استفاده از رابطه‌ی (۱) درصد زیست تخریب‌پذیری نمونه‌ها حساب شدند.

$$\text{Weight loss}=\frac{w_o-w_d}{w_o}\times 100 \qquad (۱)$$

که در این معادله W_o وزن اولیه نمونه‌ها و W_d وزن نهایی نمونه‌ها پس از خشک شدن می‌باشند.

نتایج و بحث

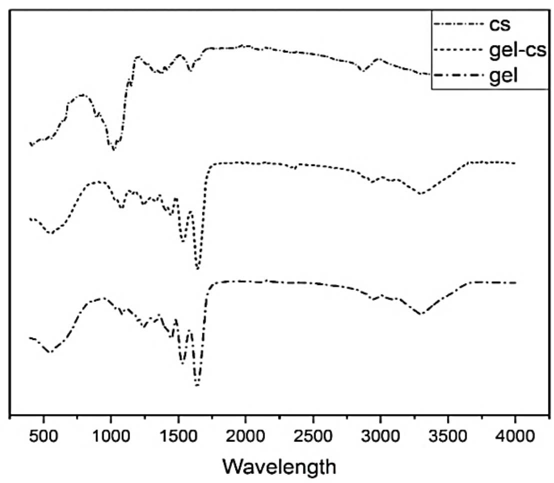
آنالیز طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز(FTIR)

شکل (۱) نتایج آنالیز FTIR نمونه‌های ژلاتین، کیتوسان و کامپوزیت اتصال عرضی نشده ژلاتین/کایتوسان را نمایش می‌دهد. با توجه به شکل (۱)، پیک ظاهر شده در محدوده‌ی cm-1 ۳۲۹۰ در نمونه‌ی ژلاتین–کیتوسان مربوط به حرکات کششی گروه هیدروکسیل(-OH)، پیک ضعیف در محدوده‌ی cm-1 ۲۹۰۰ مربوط به حرکات کششی(-CH2) بوده و همچنین در محدوده‌ی cm-1 ۱۴۰۰ نمایانگر حرکات خمشی (-CH2-) می‌باشد پیک موجود در محدوده‌ی cm-1 ۲۲۵۰ مربوط به یک اتصال پپتایدی (-N-C=O) مربوط به پروتئین‌ها دیده می‌شود. پیک موجود در محدوده‌ی cm-1 ۱۵۰۰ مربوط به حرکت کششی کربونیل می‌باشد . تغییر در پیوندهای کربنیل و آمید در طیف‌های ژلاتین و کیتوسان نشان می‌دهد که این دو یک پیوند هیدروژنی را در محدوده‌ی cm-1 ۱۵۳۸(پیک موجود در این محدوده شیفت پیدا کرده و کوچکتر شده) ایجاد می‌کنند. گروه‌های (-OH) و گروه‌های خمشی (-NH2) و گروه‌های کششی (-C=O) در ژلاتین قادر به ایجاد پیوندهای هیدروژنی با گروه‌های کششی (-OH) و خمشی(-NH2) در کیتوسان هستند [5, 9, 10, 11].

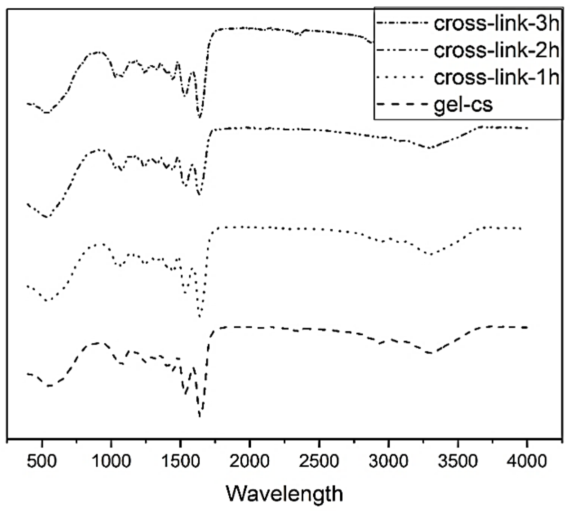
برای افزایش استحکام ساختاری ژلاتین و کیتوسان در محیط‌های آبی یا محیط‌های رطوبت بالا ایجاد اتصال عرضی یک امر الزامی می‌باشد. داربست‌ها معمولا با بخار گلوتارآلدهید اشباع می‌شوند. در نتیجه‌ی واکنش اتصال عرضی، نمونه‌ها تغییر رنگ داده و به رنگ زرد تغییر رنگ می دهند.

شکل (۲) اثر زمان اتصال عرضی روی عدد موج و شدت پیک‌های طیف GEL-CS را نمایش می‌دهد. در حقیقت اتصال

عرضی کیتوسان و مواد کلاژنی مانند ژلاتین با گلوتارآلدهید، سبب واکنش بین گروه‌های آمینوی آزاد این پلیمرها می‌شود. محدوده‌ی ۱۰۰۰cm-1 تا cm-1 ۱۲۰۰ چهار پیک جذبی وجود دارد . یک پیک جدید، بعد از ایجاد اتصال عرضی در cm-1 ۱۰۳۰ اضافه شده که نشان‌دهنده‌ی واکنش استالیزاسیون بین گروه هیدروکسیل(OH-) در کیتوسان و کربنیل (CO) در گلوتارآلدهید و ایجاد ساختار (C-O-C-O-C) می‌باشد [11].



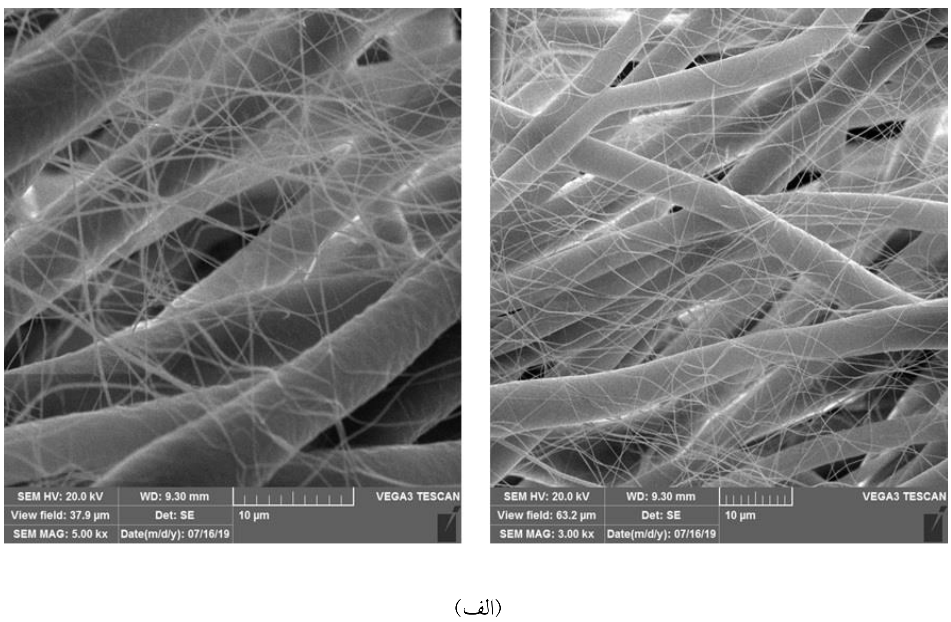
شکل ۱ نتایج حاصل از آنالیز FTIR داربست‌های ژلاتین-کیتوسان قبل از اتصال عرضی



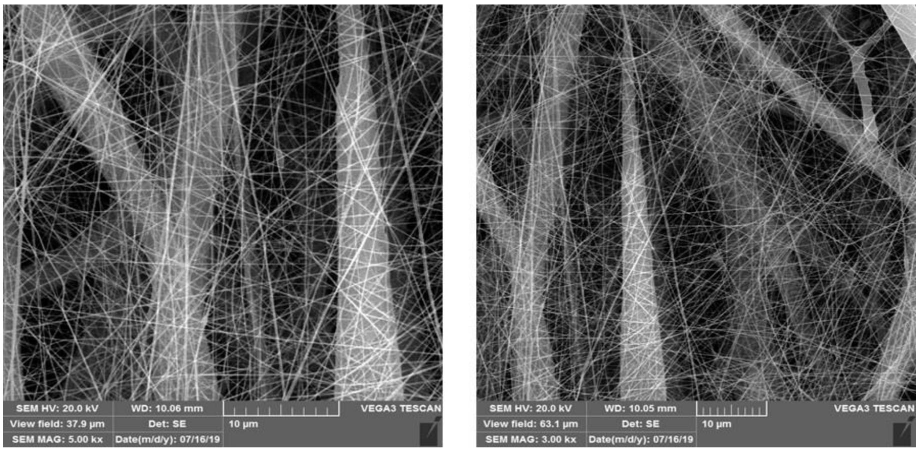
شکل ۲ اثر زمان اتصال عرضی بر روی عدد موج و شدت پیک‌های طیف GEL-CS

ارزیابی میکروسکوپی

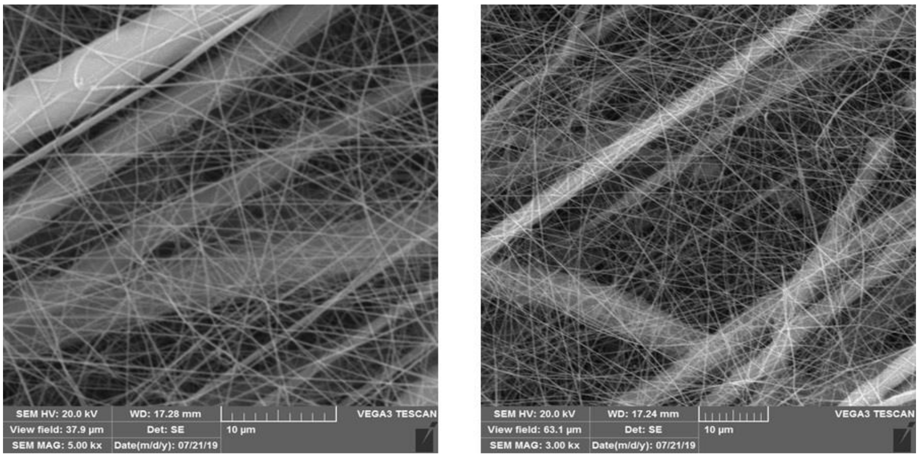
در این تحقیق کامپوزیت سه‌تایی پلی‌کاپرولاکتون-ژلاتین-کیتوسان در نسبت‌های پلی‌کاپرولاکتون به ژلاتین-کیتوسان ۹۰-۱۰، ۲۰-۸۰، ۳۰-۷۰ و ۶۰-۴۰ ساخته شد. نتایج حاصل از تصاویر میکروسکوپی روبشی SEM در شکل (۳-الف) تا (۳-پ) آورده شده است. لازم بذکر است، الیاف با قطر بیشتر مربوط به پلی‌کاپرولاکتون و الیاف با قطر کمتر نیز مربوط به ژلاتین-کیتوسان می‌باشد.



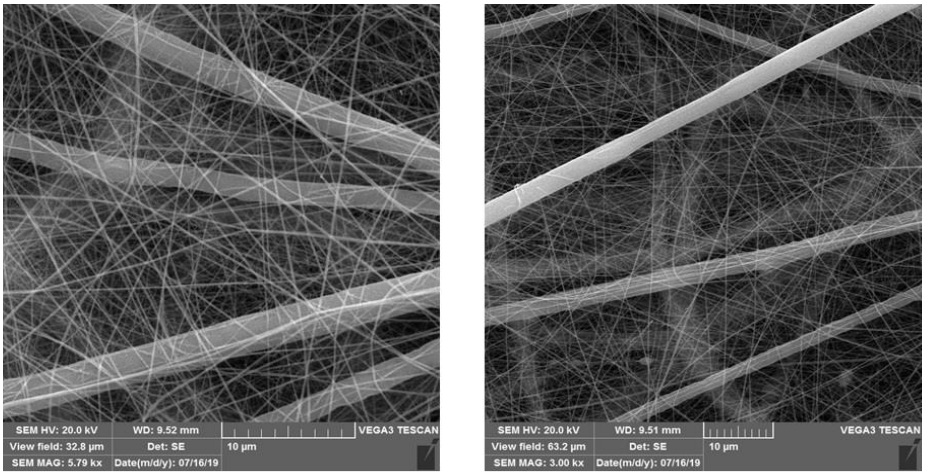
(الف)



(ب)



(پ)



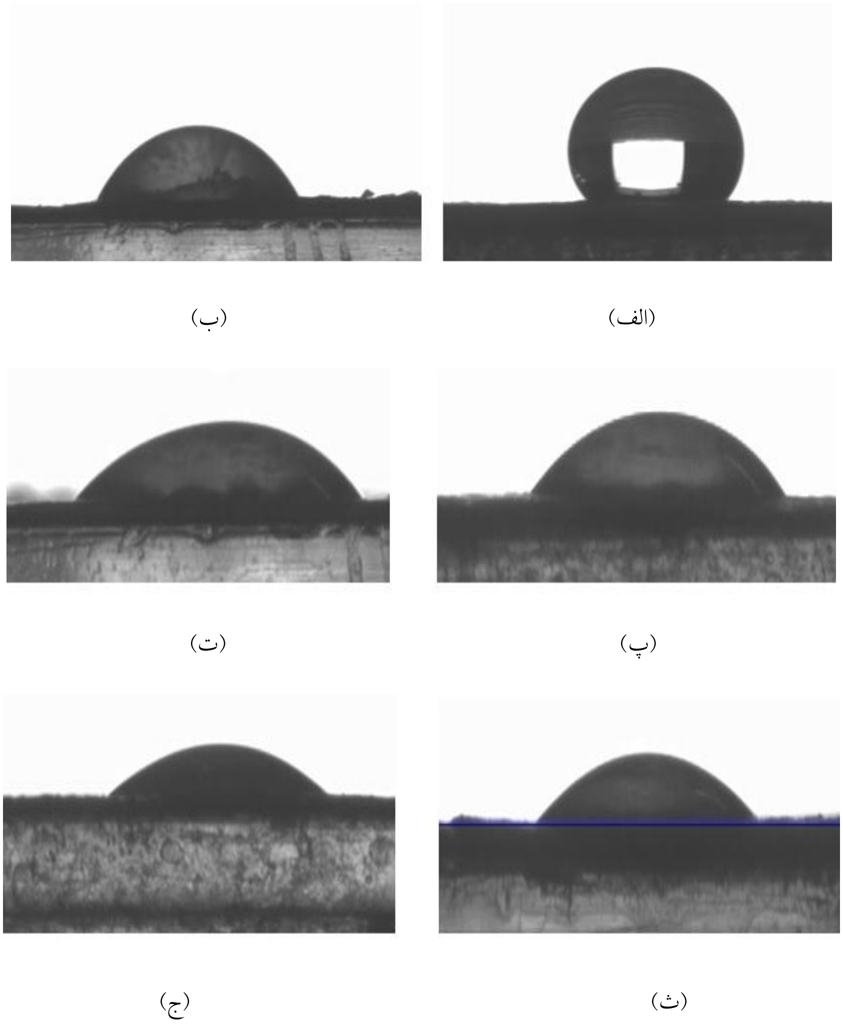
(ت)

شکل ۳ تصویر SEM الکترو‌ریسی شده از نمونه‌های پلی‌کاپرولاکتون–ژلاتین–کیتوسان در بزرگنمایی‌های مختلف:
(الف)PGC1 ، (ب)PGC2 ، (پ)PGC3 ، (ت)PGC4

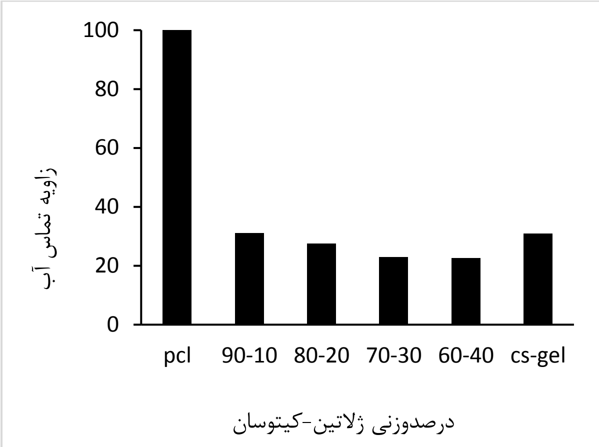
ارزیابی زاویه تماس آب

یکی از مشکلاتی که کاربرد پلی‌کاپرولاکتون را در مهندسی بافت و خصوصا داربست‌ها محدود کرده است، آب‌گریز بودن این پلیمر می‌باشد. یک پلیمر برای کاربرد در محیط بیولوژیکی بدن

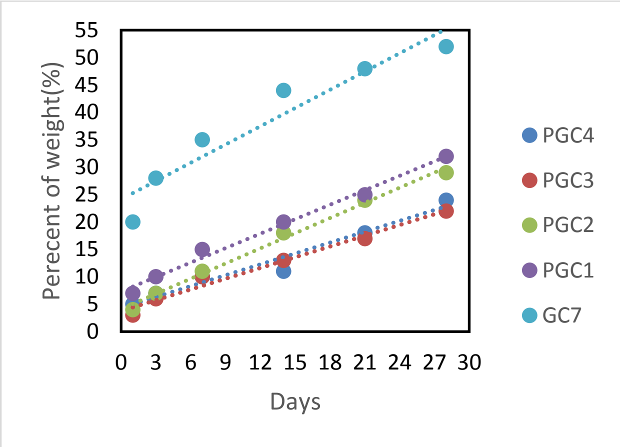
بایستی قابلیت جذب آب و تر شدن را داشته باشد، که تمایل به خیس شدن باعث چسبندگی و تکثیر بهتر سلول‌ها بر سطح الیاف پلیمری خواهد شد. تلاش‌های بسیاری برای رفع این مشکل شده است و محققان روش‌های مختلفی در این زمینه بکار گرفته‌اند. انتظار می‌رود که افزودن پلیمر های آبدوست ژلاتین و کیتوسان به پلی‌کاپرولاکتون باعث بهبود خواص آبدوستی کامپوزیت حاصل از آن شود. با توجه به نتایج حاصل از آزمون زاویه تماس دیده می‌شود که با افزایش بیشتر ژلاتین-کیتوسان به الیاف پلی-کاپرولاکتون سبب کوچکتر شدن زاویه‌ی تماس آب با سطح داربست شده است. شکل‌های (۴) و (۵) نتایج آزمون آبدوستی نمونه‌های الیاف پلی‌کاپرولاکتون، الیاف ژلاتین-کیتوسان، PGC1 ، PGC2، PGC3، PGC4 را ارایه می‌دهند. مطابق شکل با افزایش درصد ژلاتین-کیتوسان به پلی‌کاپرولاکتون، میزان آبدوستی نمونه‌ها افزایش یافته است. درحقیقت این نتایج بیانگر وابستگی آبدوستی PCL به حضور ژلاتین و کیتوسان می‌باشد. به‌طوریکه زاویه تماس داربست ساخته شده از جنس PCL حدود ۹۸ درجه درحالیکه افزودن ژلاتین و کیتوسان باعث کاهش چشمگیر آن به حدود ۲۲ درجه می‌گردد. به بیان دیگر بالا بودن زاویه تماس پلی‌کاپرولاکتون به دلیل حضور گروه‌های CH_2 در زنجیره‌ی اصلی آن می‌باشد. زاویه تماس آب در نمونه‌های کامپوزیتی با افزایش میزان الیاف ژلاتین-کیتوسان، کاهش یافته که نشان از آبدوست شدن نمونه‌های کامپوزیتی دارد. ژلاتین و کیتوسان دارای بسیاری از گروه‌های آبدوست آمین و کربوکسیل می‌باشند [12].



شکل ۴ نتیجه آزمون زاویه تماس: (الف) الیاف پلی‌کاپرولاکتون و (ب) الیاف ژلاتین-کیتوسان، (پ)PGC1، (ت) PGC2، (ث) PGC3 و (ج) PGC4



شکل ۵ تغییرات زاویه تماس آب در نمونه‌های کامپوزیتی بر حسب درصدوزنی ژلاتین-کیتوسان

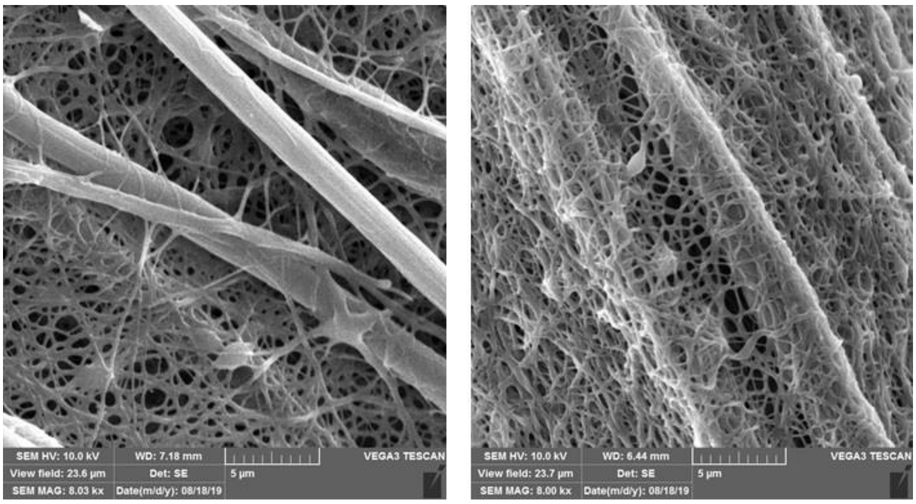


شکل ۶ ارزیابی کاهش وزن نمونه‌ها در اثر غوطه‌وری در محلول فسفات بافر سالین

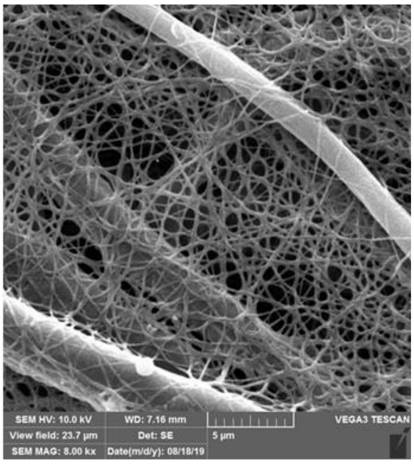
ارزیابی زیست‌تخریب‌پذیری

به منظور بررسی اثر الیاف ژلاتین-کیتوسان بر تخریب‌پذیری داربست‌های پلی‌کاپرولاکتون- ژلاتین- کیتوسان، ارزیابی تخریب‌پذیری در محلول فسفات بافر سالین انجام شد. کاهش وزن داربست‌های ساخته شده با گذشت زمان در شکل (۶) نشان داده شده است. همه‌ی داربست‌ها دچار کاهش وزن شده‌اند، که با توجه به اینکه ماهیت پلی‌کاپرولاکتون آب‌گریز و ماهیت ژلاتین-کیتوسان آب‌دوست می‌باشد، بیشترین میزان تخریب در الیاف ژلاتین-کیتوسان می‌باشد، چراکه جذب آب در این الیاف بیشتر می‌باشد.

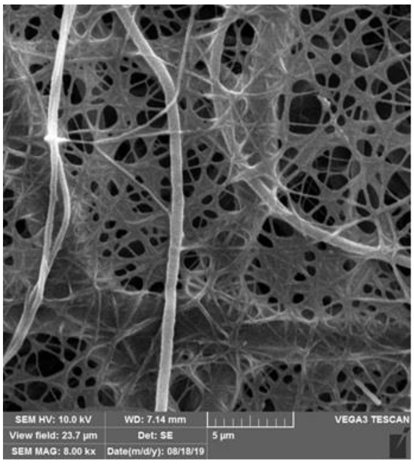
شکل (۷) تصاویر میکروسکوپ الکترونی از سطح داربست PGC4 بعد از غوطه‌وری در محلول فسفات بافر سالین به مدت ۱، ۳، ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ روز را ارایه می‌دهد. مشاهده می‌شود که تعداد ریزحفره‌های موجود در بین الیاف افزایش یافته و همچنین ناهمواری سطح دچار افزایش شده است. جذب آب توسط الیاف ژلاتین-کیتوسان باعث تخریب زمینه‌ی پلیمری و به وجود آمدن حفره‌های بزرگتر گردیده است. همانطور که در تصاویر نیز مشخص است با گذشت زمان نیز تخریب بیشتر و همچنین زبری سطح نیز بیشتر شده است که این زبری سطح باعث چسبندگی بیشتر سلول‌ها در سطح داربست‌ها می‌شود.



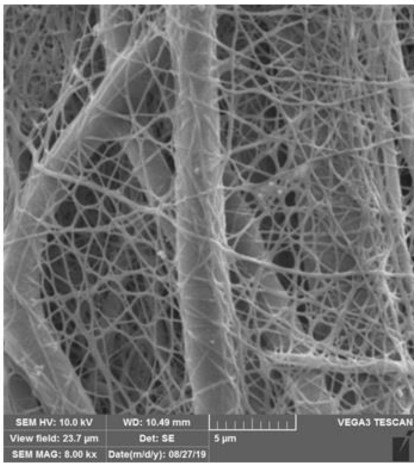
(الف) (ب)



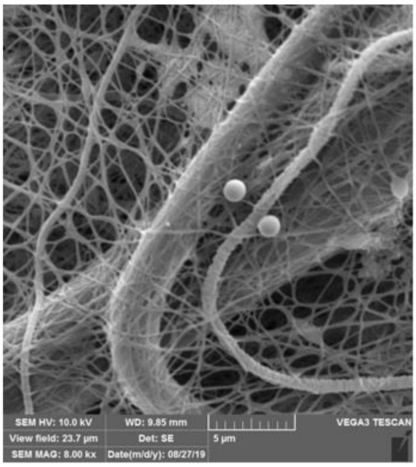
(پ)



(ت)



(ث)



(ج)

شکل ۷ تصاویر SEM مربوط به ارزیابی زیست‌تخریب‌پذیری برای نمونه PGC4، (الف) ۱ روز، (ب)۳ روز، (پ) ۷ روز، (ت) ۱۴ روز، (ث) ۲۱ روز، (ج) ۲۸ روز

نتیجه‌گیری

در این پژوهش سعی در ساخت و ارزیابی خواص داربست‌های کامپوزیت سه‌تایی، از سه پلیمر پلی‌کاپرولاکتون-ژلاتین-کیتوسان با روش الکتروریسی شده است. نتیجه‌گیری حاصل از ارزیابی‌ها و آزمون‌های انجام شده در پژوهش حاضر در ادامه آمده است.

۱. در ارزیابی FTIR حضور کیتوسان و ژلاتین در نمونه‌های ژلاتین-کیتوسان اثبات و همچنین بعد از ایجاد اتصال عرضی در عدد موج $۱۰۳۰cm^{-1}$ پیک جدیدی ظاهر گردید که بیانگر واکنش استالیزاسیون بین گروه هیدروکسیل (-OH) در کیتوسان و کربنیل (CO) در گلوتارآلدهید جهت تشکیل ساختار (C-O-C-O-C) می‌باشد.

۲. نتایج حاصل از آزمون زاویه تماس آب بیانگر وابستگی آبدوستی PCL به حضور ژلاتین و کیتوسان می‌باشد. به‌طوریکه زاویه تماس داربست ساخته شده از جنس PCL حدود ۹۸ درجه درحالیکه افزودن ژلاتین و کیتوسان باعث کاهش چشمگیر آن به حدود ۲۲ درجه می‌گردد.

۳. ارزیابی تخریب‌پذیری در محلول فسفات بافر سالین نشان داد که کاهش وزن داربست‌های ساخته شده با گذشت زمان از ۱ تا ۲۸ روز برای همه‌ی داربست‌ها اتفاق می‌افتد. با توجه به اینکه ماهیت پلی‌کاپرولاکتون آب‌گریز و ماهیت ژلاتین-کیتوسان آب‌دوست می‌باشد.

۴. بیشترین میزان تخریب در الیاف ژلاتین-کیتوسان با بیش از ۵۰

درصد تخریب پس از ۲۸ روز و کمترین میزان تخریب مربوط به نمونه حاوی ۷۰ درصد وزنی PCL با کمتر از ۲۳ درصد تخریب پس از ۲۸ روز می‌باشد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله از پرسنل آزمایشگاه پلیمر دانشکده مهندسی دانشگاه شیراز و معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه شیراز کمال قدردانی دارند.

مراجع

[1] R. Cheng, F. Chen, K. Chen and J. Xua, "Advances in the application of hydrogel-based scaffolds for tendon repair", *Genes & Diseases*, pp. 101019, (2023). https://doi.org/10.1016/j.gendis.2023.04.039.

[2] M. S. Baburaj, M. G. Veeran, D. Painuly, S. Sreelekshmi, R. J. Rajkumar and A. S. Aprem, " Fabrication and characterisation of polycaprolactone/gelatin/chitosan (PCL/GEL/CHI) electrospun nano-membranes for wastewater purification", *Desalination*, vol. 563, pp. 116709, (2023). https://doi.org/10.1016/j.desal.2023.116709.

[3] S. Gautam, S. D. Purohit, N. Chandra Mishra, "Surface modification of PCL-gelatin-chitosan electrospun scaffold by nano-hydroxyapatite for bone tissue engineering", *Materials Today Communications*, vol. 34, pp. 105237, (2023). https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2022.105237

[4] H. Homayoni, S. A. H. Ravandi, and M. Valizadeh, "Electrospinning of chitosan nanofibers: Processing optimization," *Carbohydrate Polymers*, vol. 73, no. 3, pp. 656-661, (2009). https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.02.008.

[5] J. Jafari, S. H. Emami, A. Samadikuchaksaraei, M. A. Bahar, and F. Gorjipour, "Electrospun chitosan-gelatin nanofiberous scaffold: Fabrication and in vitro evaluation", *Bio-Medical Materials and Engineering*, vol. 21, no. 2, pp. 99-112, (2011). https://doi.org/10.3233/BME-2011-0660 .

[6] S. Gautam, C. F. Chou, A. K. Dinda, P. D. Potdar, and N. C. Mishra, "Fabrication and characterization of PCL/gelatin/chitosan ternary nanofibrous composite scaffold for tissue engineering applications", *Journal of Materials Science*, vol. 49, no. 3, pp. 1079-1089, (2014). https://doi.org/10.1007/s10853-013-7785-8 .

[7] Y. Zhang, H. Ouyang, T. L. Chwee, S. Ramakrishna, and Z. M. Huang, "Electrospinning of gelatin fibers and gelatin/PCL composite fibrous scaffolds", *Journal of Biomedical Materials Research Part B*, vol. 72, no. 1, pp. 156-165, (2005). https://doi/10.1002/jbm.b.30128.

[8] W. Yang, J. Fu, D. Wang, T. Wang, H. Wang, S. Jin and N. He, "Study on chitosan/polycaprolactone blending vascular scaffolds by electrospinning", *Journal of Biomedical Nanotechnology*, vol. 6, no. 3, pp. 254-259, (2010). https://doi.org/10.1166/jbn.2010.1123 .

[9] B. Dhandayuthapani, U. M. Krishnan and S. Sethuraman, "Fabrication and characterization of chitosan-gelatin blend nanofibers for skin tissue engineering," *Journal of Biomedical Materials Research Part B*, vol. 94, no. 1, pp. 264-272, (2010). https://doi/10.1002/jbm.b.31651.

[10] S. Haider, W. A. Al-Masry, N. Bukhari and M. Javid, "Preparation of the chitosan containing nanofibers by electrospinning chitosan-gelatin complexes", *Polymer Engineering and Science*, vol. 50, no. 9, pp. 1887-1893,

(2010). https://doi.org/10.1002/pen.21721.

[11] Y. F. Qian, K. H. Zhang, F. Chen, Q. F. Ke and X. M. Mo, "Cross-linking of gelatin and chitosan complex nanofibers for tissue-engineering scaffolds," *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, vol. 22, no. 8, pp. 1099-1113, (2011). https://doi/abs/10.1163/092050610X499447.

[12] Y. Qian, Z. Zhang, L. Zheng, R. Song and Y. Zhao, "Fabrication and characterization of electrospun polycaprolactone blended with chitosan-gelatin complex nanofibrous mats", *Journal of Nanomaterials*, vol. 2014, (2014). https://doi.org/10.1155/2014/964621.